

# 瓣膜内皮损伤致钙化性主动脉瓣疾病的分子机制

卢俊权 农育新 魏学标 余丹青

**【摘要】** 钙化性主动脉瓣疾病 (CAVD) 是近年来常见的心血管疾病之一,其具体的发病机制尚不明确。瓣膜内皮细胞 (VEC) 是维持主动脉瓣稳态的屏障,机械力学因素、一氧化氮代谢障碍、氧化应激、脂质沉积和炎症均可引起 VEC 损伤,导致主动脉瓣钙化。此外,VEC 还可以通过一氧化氮或内皮间充质转化来调节瓣膜间质细胞,影响主动脉瓣钙化的过程。该文总结了近年来 VEC 对 CAVD 的影响调控机制,为 CAVD 的治疗提供参考。

**【关键词】** 钙化性主动脉瓣疾病;瓣膜内皮细胞;瓣膜间质细胞;钙化

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2024.04.006

钙化性主动脉瓣疾病 (CAVD) 是全球范围内常见的钙化性心血管疾病之一。高收入国家的瓣膜疾病类型以退行性病变为主,低收入和中等收入国家以风湿性心脏病为主<sup>[1]</sup>。在过去的 30 多年里,发达国家的 CAVD 的患病率逐年上升,年龄标化患病率从 1990 年的每 10 万人约 45.5 例上升到 2019 年的每 10 万人约 116.3 例,年发病人数高达 280 万<sup>[2-3]</sup>。中国约有 2 500 万瓣膜性心脏病患者,主要为风湿性瓣膜病变,约占 55.1%,随着老龄化进程加快,CAVD 的患病率迅速上升<sup>[4]</sup>。CAVD 目前尚缺乏特异性的药物治疗措施,外科瓣膜置换是其主要的治疗方式<sup>[5]</sup>。接受瓣膜置换的患者多数已到达中晚期,疾病早期的患者往往缺乏足够的干预措施。因此,积极寻找新的治疗干预靶点对于延缓或逆转 CAVD 的进展具有重要意义。

瓣膜间质细胞 (VIC) 是主导 CAVD 发生、进展的关键细胞,是研究 CAVD 的经典细胞模型<sup>[6]</sup>。瓣膜所处的结构环境因素如细胞外基质 (ECM)、血流机械作用力、免疫细胞浸润等均可影响 CAVD 的发生、进展<sup>[7-8]</sup>。瓣膜内皮细胞 (VEC) 是另 1

类瓣膜常驻细胞,主要以单层细胞形式衬附在瓣膜表面,能感知流体动力变化,调控瓣膜的发育和形态形成<sup>[9]</sup>。VEC 与 VIC 相互联系并作为一种特殊的内皮细胞在 CAVD 的发生、进展中发挥独特作用<sup>[10]</sup>。

## 1 VEC 的结构功能

VEC 在胚胎时期心内膜垫形成后即开始分化和发育,并随着胚胎的发育演变,经过内皮间充质转化 (EndMT) 分化成瓣膜小叶间质细胞,进而影响瓣膜的最终形态<sup>[11]</sup>。与血管内皮细胞主要受到血流的层流作用力不同,VEC 主要受到来自血流的剪切力。瓣膜在心腔中面临比血管内皮细胞更加复杂的力学环境,表现出更为独特的病理钙化类型,与血管内皮动脉粥样硬化和斑块形成有所不同<sup>[12]</sup>。VEC 会随着胎儿发育发生适应性形态学改变,靠近心室面的主动脉瓣 VEC 呈现出扁平状,而靠近主动脉侧的主动脉瓣则呈现出近似长方体状,这可能是在不同机械作用力下瓣膜为了维持自身完整性所形成的差异<sup>[11]</sup>。

与其他内皮细胞类似,VEC 除了能够通过分化促进瓣膜发育生长外,还能在瓣膜损伤后起到修复作用,具有较强的可塑性。瓣膜损伤后 VIC 可以通过 VEC 的分化得到补充和重建<sup>[12]</sup>,有研究显示 CAVD 患者的瓣膜中内皮祖细胞的数量和再生修复能力均下降,同时内皮的结构完整性也在疾病早期遭到破坏<sup>[13]</sup>。VEC 还可以感知外周基质环境,

基金项目:广东省冠心病防治研究重点实验室项目 (Y0120220151); 国家自然科学基金 (82002014); 广东省自然科学基金 (2021A151010107); 广东省医学科研基金 (A2019409); 广州市科技计划项目 (201704020124)

作者单位:510080 广州,广东省医学科学院广东省心血管病研究所 广东省人民医院心血管内科广东省冠心病防治研究重点实验室 (卢俊权,农育新,余丹青); 510080 广州,广东省人民医院老年重症医学科 广东省老年医学研究所 (魏学标)

通信作者:余丹青, E-mail: yudanqing@gdph.org.cn

通过旁分泌途径调控 VIC 的活化<sup>[14]</sup>。有研究提出瓣膜细胞环境稳态设想, VEC、VIC 和外基质中任何一方出现损伤都会引发另外两方结构和功能改变,进而打破平衡<sup>[10]</sup>。

## 2 VEC 损伤的因素

### 2.1 机械力学损伤

血流动力学紊乱可使 VEC 受损。VEC 与血流直接接触,承受了大部分血流冲击产生的剪切力和摩擦力<sup>[15]</sup>。目前已经证明的 VEC 与剪切力相关的系列基因和通路有黏附素、整合素、转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、骨形态发生蛋白 (BMP)、Wnt/ $\beta$  连环蛋白、Notch 通路、Kruppel 样转录因子等<sup>[16]</sup>。不同的剪切力大小和变化速率会使 VEC 细胞发生不同的形态变化,分化表型也会有所差异,暴露于高震荡流体区域的瓣膜钙化程度更高<sup>[17-18]</sup>。此外,在机械压力下,VEC 的炎症信号通路会被启动,分泌干扰素、肿瘤坏死因子等炎症因子,活化瓣膜炎症环境<sup>[19]</sup>。

病理性低剪切流干扰主动脉瓣主动脉侧时,内皮功能受损,导致炎症并增强内皮细胞屏障的通透性。剪切力变化可以促进 TGF- $\beta$ 1 的表达,导致主动脉瓣中 BMP-4 的表达增加,进一步诱导主动脉瓣叶中的血管细胞黏附分子 (VCAM)-1 和细胞间黏附分子 (ICAM)-1 的分泌<sup>[20]</sup>。与静态对照和稳定剪切相比,承受振荡剪切的猪主动脉瓣内皮细胞中的炎症细胞因子 *VCAM-1*、*ICAM-1* 基因和核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 在各个水平上均显著上调<sup>[21]</sup>。在体外,承受剪切力或复杂反流的单核细胞表现出细胞黏附分子的上调和单核细胞对内皮的黏附增加<sup>[22]</sup>。黏附分子 (如 ICAM-1 和 VCAM-1) 的表达增加,加上 VEC 对剪切应力和细胞因子变化的反应,向循环炎症细胞瓣膜富集有助于 CAVD 的进展。

### 2.2 一氧化氮代谢障碍与氧化应激

一氧化氮 (NO) 的合成和代谢在维持内皮细胞的功能稳态如调节血管扩张和通透性、维持血管抗炎、抗氧化等方面发挥重要作用<sup>[23]</sup>。NO 是 VEC 维持瓣膜稳态的重要因素。研究表明心室侧面 VEC 是瓣膜 NO 的主要来源,能够抑制早期瓣膜细胞的成骨分化,缺乏一氧化氮合酶 (NOS) 的小鼠会出现瓣膜发育异常和瓣膜纤维化<sup>[24]</sup>。CAVD 患者中四氢叶酸水平显著下降,使 NO 合成受阻并导致过氧亚硝酸盐形成,诱导 VIC 的成骨分化<sup>[25]</sup>。

此外,VEC 中的 NO 水平下降会解除 VIC 中 NF- $\kappa$ B 的抑制,促进二肽基肽酶 (DPP)-4 的表达,进一步抑制胰岛素样生长因子-1 生成,加速 CAVD 的进展<sup>[26]</sup>。

主动脉瓣狭窄钙化区超氧化物和过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 水平显著升高,钙化主动脉瓣氧化应激的增加与 NOS 的解联有关,但与还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 氧化酶活性的增加无关<sup>[25]</sup>。Montorfano 等<sup>[27]</sup>还发现  $H_2O_2$  可以通过人活化素受体样激酶 (ALK) 5/细胞信号转导分子 (Smad) 3/NF- $\kappa$ B 途径下调内皮细胞标志物水平,上调纤维化和 ECM 蛋白水平。 $H_2O_2$  也可通过促丝裂原活化的蛋白激酶 (MAPK) 磷酸化增加 TGF- $\beta$ 2 和 TGF- $\beta$ 38 的表达<sup>[27]</sup>,诱导内皮细胞向肌成纤维细胞转化,进而促进瓣膜钙化进程。

### 2.3 脂质沉积与炎症

脂质沉积可能在 CAVD 的早期阶段发挥重要作用,内皮屏障功能障碍是 CAVD 早期的关键事件,主要表现为通透性和内皮细胞分泌特征的变化,导致内皮黏附功能受损。脂蛋白 a [Lp(a)] 可能通过 Rho/RhoK 依赖性信号通路及细胞表面的赖氨酸结合位点增加内皮细胞的通透性。Lp(a) 可通过影响内皮中各种蛋白质的表达而导致细胞间黏附功能丧失。Lp(a) 还可以通过氧化磷脂 (OxPL) 上调果糖-2,6-二磷酸 (PFKFB)-3 的表达,介导糖酵解以激活内皮功能,进而损害细胞间黏附并损害内皮功能<sup>[28]</sup>。在 Lp(a) 升高的患者中,Lp(a) 参与 ICAM-1 表达水平上调,体外实验中加入 Lp(a) 后,人主动脉内皮细胞 (HAEC) 与正常单核细胞孵育过程中 ICAM-1 和 VCAM-1 表达增加,提示 Lp(a) 可诱导其分泌并影响 HAEC 的黏附功能<sup>[28]</sup>。

活性氧 (ROS) 中间体或细胞产生的自由基可引起细胞外组织中低密度脂蛋白 (LDL) 的氧化修饰。随着内皮细胞中内皮细胞选择素 E-selectin、ICAM-1 和 VCAM-1 等黏附分子水平的上调,炎症细胞 (如单核细胞和 T 淋巴细胞) 可以黏附并浸润瓣膜下内皮。炎症细胞可以分化成巨噬细胞,通过清道夫受体吞噬氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL),然后进一步转化为泡沫细胞<sup>[29-30]</sup>。此外,巨噬细胞、T 淋巴细胞和肥大细胞随着氧化脂质的摄取而被激活<sup>[31-32]</sup>。由于 ox-LDL 的存在,入侵的免疫细胞释放促炎和促纤维化的细胞因子,这会加重炎症反应

及瓣膜钙化<sup>[33]</sup>。

此外, Lp(a) 通过 OxPL 介导促炎反应, 提高促炎细胞因子(如 IL-1)的表达水平来促进 VEC 的炎症反应<sup>[34]</sup>。在 CAVD 的过程中, Lp(a) 的促炎作用主要由 OxPL 介导, 不仅直接诱导炎症相关基因的表达<sup>[35]</sup>, 还通过骨形成信号表现出来, 如 OxPL 可以通过人自分泌运动因子(ATX)介导的 NF- $\kappa$ B 信号转导间接激活 IL-6, 以促进瓣膜细胞的炎症反应<sup>[36]</sup>, 并通过上述机制使瓣膜增厚和钙化。上述研究表明, Lp(a) 和 OxPL 可能通过直接诱导相关炎症基因 IL-1 和 NF- $\kappa$ B/IL-6 通路的表达来促进 CAVD, 这种促炎作用可能在瓣膜钙化的早期阶段发挥重要作用。

### 3 内皮间质转化

在病理条件下, VEC 可以通过 EndMT 主动诱导 VIC 的病理重构和钙化。健康瓣膜中的 VEC 可以通过 EndMT 补充 VIC 数量来保持瓣膜的完整性和完整功能<sup>[37]</sup>。VEC 有类似水库的功能, 一旦 VIC 缺失或失去其完整功能, VEC 可以转化为 VIC 并穿入瓣叶。相反, 如果 VIC 结构完好无损, EndMT 将会停止<sup>[38]</sup>。Hjortnaes 等<sup>[37]</sup>的研究显示, 与单独使用 TGF- $\beta$ 1 诱导的 VEC 相比, EndMT 相关标志物在 VIC 条件培养基中的抑制比例为 1 : 1, 他们还发现 VIC 的存在抑制了 TGF- $\beta$ 1 诱导的 VEC 迁移。这些发现表明, VIC 能够抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的 VEC EndMT。然而, 当病理因素不断刺激主动脉瓣时, 这种可以维持瓣膜稳态的精细调节过程就会被破坏, VIC 逐渐丧失功能, EndMT 的抑制作用减弱<sup>[38]</sup>。TGF- $\beta$ 1 诱导 VIC 分化为活性肌成纤维细胞, 随后诱导 ECM 重构和成骨细胞分化, 最终引起主动脉瓣钙化。此时肌成纤维细胞可发生细胞凋亡, 最终形成弥漫性钙化<sup>[6]</sup>。这种钙化模式是主动脉瓣钙化的主要原因, 约占所有钙化沉积的 83%<sup>[39]</sup>。此外, 在 13% 的钙化瓣膜中还发现了在 NF- $\kappa$ B 受体活化因子(RANK/RANKL)、外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶(ENPP)1 和 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白机制作用下 VIC 成骨分化形成的成熟层状骨<sup>[39-40]</sup>。

### 4 小结

VEC 在诱导和促进主动脉瓣钙化方面至关重要。VEC 是与血流直接接触的瓣膜结构, 承受了大部分的血流冲击产生的剪切力和摩擦力, 其形态和行为受到血流动力学调节。VEC 是维持主动脉瓣

稳态的屏障, 该屏障的直接损伤会引发脂质沉积、炎症浸润和氧化应激, 最终导致主动脉瓣钙化。同时, VEC 还可以通过 NO 或 EndMT 来调节 VIC, 影响主动脉瓣钙化的过程。

### 参 考 文 献

- [1] Coffey S, Roberts-Thomson R, Brown A, et al. Global epidemiology of valvular heart disease[J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(12):853-864.
- [2] Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990-2019: update from the GBD 2019 study[J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(25):2982-3021.
- [3] Yi B, Zeng WK, Lv L, et al. Changing epidemiology of calcific aortic valve disease: 30-year trends of incidence, prevalence, and deaths across 204 countries and territories[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(9):12710-12732.
- [4] 中国心血管健康与疾病报告2021编写组. 《中国心血管健康与疾病报告2021》概述[J]. 中国心血管病研究, 2022, 20(07):577-596.
- [5] Thaden JJ, Nkomo VT, Enriquez-Sarano M. The global burden of aortic stenosis[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2014, 56(6):565-571.
- [6] Rutkovskiy A, Malashicheva A, Sullivan G, et al. Valve interstitial cells: the key to understanding the pathophysiology of heart valve calcification[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(9):e006339.
- [7] Di Vito A, Donato A, Presta I, et al. Extracellular matrix in calcific aortic valve disease: architecture, dynamic and perspectives[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2):913.
- [8] Zhang PJ, The E, Luo ZC, et al. Pro-inflammatory mediators released by activated monocytes promote aortic valve fibrocalcific activity[J]. Mol Med, 2022, 28(1):5.
- [9] Dye B, Lincoln J. The endocardium and heart valves[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2020, 12(12):a036723.
- [10] Driscoll K, Cruz AD, Butcher JT. Inflammatory and biomechanical drivers of endothelial-interstitial interactions in calcific aortic valve disease[J]. Circ Res, 2021, 128(9):1344-1370.
- [11] Bischoff J, Aikawa E. Progenitor cells confer plasticity to cardiac valve endothelium[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2011, 4(6):710-719.
- [12] Greenspan LJ, Weinstein BM. To be or not to be: endothelial cell plasticity in development, repair, and disease[J]. Angiogenesis, 2021, 24(2):251-269.
- [13] Matsumoto Y, Adams V, Walther C, et al. Reduced number and function of endothelial progenitor cells in patients with aortic valve stenosis: a novel concept for valvular endothelial cell repair[J]. Eur Heart J, 2009, 30(3):346-355.
- [14] Hunyadi J, Farkas B, Oláh J, et al. Keratinocyte transplantation: covering of skin defects with autologous keratinocytes[J]. Orv Hetil, 1987;128(46):2409-2411.
- [15] Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular



- endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives[J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(1):327-387.
- [16] Butcher JT, Nerem RM. Valvular endothelial cells and the mechanoregulation of valvular pathology[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2007, 362(1484):1445-1457.
- [17] Deb N, Ali MS, Mathews A, et al. Shear type and magnitude affect aortic valve endothelial cell morphology, orientation, and differentiation[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, 246(21):2278-2289.
- [18] Hsu CD, Tchir A, Mirza A, et al. Valve endothelial cell exposure to high levels of flow oscillations exacerbates valve interstitial cell calcification[J]. *Bioengineering (Basel)*, 2022, 9(8):393.
- [19] Parra-Izquierdo I, Sánchez-Bayuela T, López J, et al. Interferons are pro-inflammatory cytokines in sheared-stressed human aortic valve endothelial cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19):10605.
- [20] Sucosky P, Balachandran K, Elhammali A, et al. Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4- and TGF-beta1-dependent pathway[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(2):254-260.
- [21] Mahler GJ, Frendl CM, Cao QF, et al. Effects of shear stress pattern and magnitude on mesenchymal transformation and invasion of aortic valve endothelial cells[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111(11):2326-2337.
- [22] Dayawansa NH, Baratchi S, Peter K. Uncoupling the vicious cycle of mechanical stress and inflammation in calcific aortic valve disease[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022;9:783543.
- [23] Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, et al. Nitric oxide and endothelial dysfunction[J]. *Crit Care Clin*, 2020, 36(2):307-321.
- [24] El Accaoui RN, Gould ST, Hajj GP, et al. Aortic valve sclerosis in mice deficient in endothelial nitric oxide synthase[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 306(9):H1302-H1313.
- [25] Liu ZT, Dong NG, Hui HP, et al. Endothelial cell-derived tetrahydrobiopterin prevents aortic valve calcification[J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(17):1652-1664.
- [26] Choi B, Lee S, Kim SM, et al. Dipeptidyl peptidase-4 induces aortic valve calcification by inhibiting insulin-like growth factor-1 signaling in valvular interstitial cells[J]. *Circulation*, 2017, 135(20):1935-1950.
- [27] Montorfano I, Becerra A, Cerro R, et al. Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF-β1 and TGF-β2-dependent pathway[J]. *Lab Invest*, 2014, 94(10):1068-1082.
- [28] Schnitzler JG, Hoogeveen RM, Ali L, et al. Atherogenic lipoprotein(a) increases vascular glycolysis, thereby facilitating inflammation and leukocyte extravasation[J]. *Circ Res*, 2020, 126(10):1346-1359.
- [29] Yetkin E, Waltenberger J. Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis[J]. *Int J Cardiol*. 2009, 135(1):4-13.
- [30] Conte M, Petraglia L, Campana P, et al. The role of inflammation and metabolic risk factors in the pathogenesis of calcific aortic valve stenosis[J]. *Aging Clin Exp Res*, 2021, 33(7):1765-1770.
- [31] Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, et al. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies[J]. *Circulation*, 1994, 90(2):844-853.
- [32] Mathieu P, Bouchareb R, Boulanger MC. Innate and adaptive immunity in calcific aortic valve disease[J]. *J Immunol Res*, 2015:851945.
- [33] Mathieu P, Boulanger MC. Basic mechanisms of calcific aortic valve disease[J]. *Can J Cardiol*, 2014, 30(9):982-993.
- [34] van der Valk FM, Bekkering S, Kroon J, et al. Oxidized phospholipids on lipoprotein(a) elicit arterial wall inflammation and an inflammatory monocyte response in humans[J]. *Circulation*, 2016, 134(8):611-624.
- [35] Serbulea V, Upchurch CM, Ahern KW, et al. Macrophages sensing oxidized DAMPs reprogram their metabolism to support redox homeostasis and inflammation through a TLR2-Syk-ceramide dependent mechanism[J]. *Mol Metab*, 2018, 7:23-34.
- [36] Bochkov VN, Oskolkova OV, Birukov KG, et al. Generation and biological activities of oxidized phospholipids[J]. *Antioxid redox signal*, 2010, 12(8):1009-1059.
- [37] Hjortnaes J, Shaper K, Goettsch C, et al. Valvular interstitial cells suppress calcification of valvular endothelial cells[J]. *Atherosclerosis*, 2015, 242(1):251-260.
- [38] Rattazzi M, Pauletto P. Valvular endothelial cells: guardians or destroyers of aortic valve integrity?[J]. *Atherosclerosis*, 2015, 242(2):396-398.
- [39] Mohler ER 3rd, Gannon F, Reynolds C, et al. Bone formation and inflammation in cardiac valves [J]. *Circulation*, 2001, 103(11):1522-1528.
- [40] Zhou YZ, Li JM, Zhou K, et al. The methylation of Notch1 promoter mediates the osteogenesis differentiation in human aortic valve interstitial cells through Wnt/β-catenin signaling[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11):20366-20376.

( 收稿:2023-08-08 修回:2024-04-05 )

( 本文编辑:王雨婷 )